

24729

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-258288

(43) 公開日 平成4年(1992)9月14日

(51) Int.Cl.⁵

C 1 2 N 9/02

識別記号

庁内整理番号

7823-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数4(全 4 頁)

(21) 出願番号 特願平3-20049

(22) 出願日 平成3年(1991)2月13日

(71) 出願人 000003159

東レ株式会社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

(72) 発明者 河野 源

神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会

社基礎研究所内

(72) 発明者 小島 俊二

神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会

社基礎研究所内

(54) 【発明の名称】 ウミホタル・ルシフェラーゼの製造法

(57) 【要約】

【目的】 ウミホタルから、高純度のルシフェラーゼを高収率で製造する方法を提供する。

【構成】 ウミホタルを、塩を含有する蒸留水又は緩衝液中に浸漬し、ルシフェラーゼを抽出させ、次いで該抽出液を、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーの1種以上のクロマトグラフィーにより精製する。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ウミホタルを、塩を含有する蒸留水又は緩衝液中に浸漬し、ルシフェラーゼを抽出させることを特徴とするウミホタル・ルシフェラーゼの製造法。

【請求項2】 ウミホタルからの抽出液をクロマトグラフィーで精製することを特徴とする請求項1記載のウミホタル・ルシフェラーゼの製造法。

【請求項3】 クロマトグラフィーが、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーの1種以上である請求項2 10 記載のウミホタル・ルシフェラーゼの製造法。

【請求項4】 a. ウミホタルからの抽出液に硫酸を加え、不溶性物質を遠心分離で除去する工程、b. 得られた清澄液を疎水クロマトグラフィーで精製する工程、およびc. イオン交換クロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィーの1種以上により精製する工程からなる請求項1記載のウミホタル・ルシフェラーゼの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は海洋生物ウミホタル (*Cypridina hilgendorfi*) から、高純度のルシフェラーゼを高収率で製造する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 近年、DNAプローブ法が遺伝子レベルでの病因解明の為、特異性の高い、新しい診断法として注目を集めているが、検出法に放射性同位元素が使用されている為、作業者、施設、放射性廃棄物等の制約があり、広く普及するには至っていない。従って、DNAプ 30 ロープ法の普及には放射性同位元素を使わない方法の開発が必要であるが、比色法や蛍光法等の検出系は感度が低く、実用的でなく、これらに変わる新しい検出系の開発が望まれている。

【0003】 現在、生物発光法が、放射性同位元素を用いる場合に匹敵する検出感度を持つことに着目した研究が行われており、これまで、生物発光としてはホタルや発光バクテリアのルシフェラーゼが利用されているが、酵素自体が不安定なため、期待される程の感度は得られていない。しかし、ウミホタル・ルシフェラーゼは安定 40 性が良く、発光強度も強く、生物発光を用いる高感度検出系として、DNAプローブ法又は酵素免疫測定法等への応用が期待されている。

【0004】 ウミホタルは、日本沿岸に生息する2~3mmの海産甲殻類で、昼間は海底の砂の中に住み、夜間に死魚等の餌を求めて遊泳し、刺激を受けると海水中にルシフェリンとルシフェラーゼを放出する。海水中でルシフェリンは酵素ルシフェラーゼと海水中の溶存酸素によって酸化され、発光する【後藤等：ファルマシア、 3, 125 (1967)】。この反応はホタルや発光バ 50

2

クテリアのように、発光にATPなどの他の成分を必要としない非常に簡単な発光系である[Bioluminescence in Progress, 115p. (1966) Princeton Univ. Press]。

【0005】 ウミホタルからルシフェラーゼを分離する方法としては、ウミホタルを凍結乾燥し、微粉碎して、緩衝液にて抽出した後、溶媒沈殿及び硫酸沈殿を行い、透析後、弱イオン交換クロマトグラフィー及び電気泳動で精製する方法[F. I. Tsuji等, Method 5 Enzymol., 57, 364~372 (1978)]が行われてきた。しかし、これら従来の方法では、ウミホタルを粉碎又は攪り潰したりするので、ウミホタル由来の種々のタンパク質が混入してくるため、精製度を上げる為には、収率を犠牲にして、純度の高い分画だけを集める必要がある。又、操作も複雑であり、大量に、高純度のルシフェラーゼを工業的に製造する事は困難である。

【0006】

20 【発明が解決しようとする課題】 本発明は、ウミホタルから、高純度のルシフェラーゼを高収率で製造する方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者等はウミホタルからのルシフェラーゼの製造方法について、鋭意研究した結果、ウミホタルを粉碎又は攪り潰したりする事なく、単にウミホタルを塩溶液中に放置するだけで、容易に浸透圧によりルシフェラーゼがウミホタルから抽出されてくる事を発見し、本発明を完成させた。すなわち本 30 発明は、ウミホタルを、塩を含有する蒸留水又は緩衝液中に浸漬し、ルシフェラーゼを抽出させることを特徴とするウミホタル・ルシフェラーゼの製造法である。さらに本発明は、ウミホタルから得られた抽出液をクロマトグラフィーで精製することを特徴とするウミホタル・ルシフェラーゼの製造法である。

【0008】 本発明のウミホタル・ルシフェラーゼを得るための原料としては、海岸で採取された新鮮な状態、又は凍結保存されたウミホタルを使用するが、実用的には凍結保存された原料が用いられる。採取したウミホタルを、0.5~5.0M、好ましくは0.5~2.0Mの塩を含有する蒸留水又は緩衝液に、0~30℃、好ましくは0~10℃で、1~48時間、好ましくは10~24時間浸漬させる。塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸アンモニウム等が用いられるが、好ましくは塩化ナトリウムが用いられる。緩衝液としては特に限定されないが、通常のトリス緩衝液、リン酸緩衝液等が用いられる。緩衝液は好ましくはpH5~10、さらに好ましくはpH7~8にして用いる。

【0009】 残渣を除去して得られた抽出液に、ルシフェラーゼが沈殿しない濃度の硫酸、望ましくは30~4

3

0%飽和濃度の硫酸を添加し、高分子の不純物および不溶性残渣等を遠心分離などで沈殿除去する。次いで、得られた清澄液をクロマトグラフィーで精製する。本発明で好ましく用いられるクロマトグラフィーは、疎水クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、およびアフィニティークロマトグラフィーの1種以上である。

【0010】本発明の疎水クロマトグラフィーは、セルロース、アガロース、デキストラン等の多糖類あるいは、ポリビニルなどの合成ポリマーにリガンドとして、フェニル基あるいはブチル基などの疎水性基を導入した担体を使用される。ルシフェラーゼの吸着は疎水結合が生じやすい条件たとえば硫酸アンモニウムを1~3M添加して、イオン強度を高くして行なう。疎水性担体からの溶出は、好ましくは塩濃度を段階的にあるいは勾配を持たせて下げていく方法が用いられる。上記の操作はいずれもpH7~8で行なうことが好ましい。

【0011】本発明のイオン交換クロマトグラフィーは、セルロース、アガロース、デキストラン等の多糖類あるいは、ポリビニルなどの合成ポリマーに各種官能基を導入したイオン交換体を使用されるが、ルシフェラーゼの等電点がpH4~5にあること、およびpH6以下で不安定であることから、好ましくはこれらイオン交換体のうち、ジエチルアミノエチル(DEAE)イオン交換体等の弱塩基性陰イオン交換体を使用される。ルシフェラーゼの吸着は、透析あるいはゲルろ過などで脱塩し、イオン強度を下げ望ましくはpH7~8で行なう。イオン交換体からの溶出は、イオン強度を段階的にあるいは勾配をもたせて増加させ、望ましくはpH7~8で行なう。

【0012】本発明のアフィニティークロマトグラフィーは、セルロース、アガロース、デキストラン等の多糖類あるいは、ポリビニルなどの合成ポリマーに官能基を介して、リガンドを結合させた担体を使用される。これらのうち好ましくはヘパリンアフィニティー担体あるいは金属キレートアフィニティー担体を使用される。金属キレートアフィニティー担体に結合させる金属としては、好ましくは銅イオンが用いられる。ヘパリンアフィニティー担体の吸着条件としては、透析あるいはゲルろ過などで脱塩し、イオン強度を下げて行ない、一方、溶出はイオン強度を段階的にあるいは勾配を持たせて上げていく方法で行なうことが好ましい。上記の操作はいずれも、pH7~8で行なうことが好ましい。銅キレートアフィニティー担体への吸着条件としては、pH7~8で透析あるいはゲルろ過などで脱塩し、イオン強度を下げて行ない、一方、溶出はイオン強度を段階的にあるいは勾配を持たせて上げていく方法が望ましい。

【0013】クロマトマトグラフィーは、一種でも良いが、二種以上組合せて使用するのが好ましい。以下に好ましい例を挙げるがこれに限定されない。ウミホタルか

4

ら得られた抽出液は、不溶性物質を除去した後、1~3M硫酸を含むpH5~10、好ましくはpH7~8の緩衝液で平衡化した疎水性担体を用いてクロマトグラフィーを行う。次に、ルシフェラーゼ活性を含む画分を集め、透析またはゲル濾過クロマトグラフィーで脱塩後、pH5~10、好ましくはpH7~8の緩衝液で平衡化したイオン交換クロマトグラフィー、又はアフィニティークロマトグラフィーの中から、1種又は複数のクロマトグラフィーを組み合わせて精製を行う。

10 【0014】ルシフェラーゼ活性の測定は、合成ウミホタル・ルシフェリンを基質にして、ルシフェラーゼによる発光をルミノメーターで測定することにより行われる。ルミノメーターで測定された発光量をcpsで表示し、ルシフェラーゼ活性とする。該製造方法で得られるウミホタルルシフェラーゼは還元下SDS電気泳動で、単一バンドであり、比活性2: 4×10^{13} cps/mg proteinと非常に高純度の製品である。又、還元下SDS電気泳動での分子量は約68,000を示す。

20 【0015】

【実施例】以下、本発明の実施例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

凍結保存されたウミホタル300gに1MNaClを含有した20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.1)を3,000ml加えて、4℃にて抽出を行った。一夜放置でウミホタルから約95%のルシフェラーゼが抽出された。上記抽出により、ウミホタル300gから約 8×10^{14} cps (約33mg)のルシフェラーゼが得られた。抽出液の比活性は約 3×10^{11} cps/mgであり、不純タンパク質の溶出を低減することができた。

30

【0016】実施例2

実施例1で得られた抽出液に30%飽和硫酸を添加し、生じた沈殿を遠心分離で除去した後、上清液3,100mlを、1M硫酸を含有した20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.1)で平衡化したブチルトヨバル650Mカラム(担体1,000ml、東ソー社製)に吸着させた。このカラムを1M硫酸を含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.1)で洗浄し、1Mから0Mへの硫酸の直線濃度勾配でルシフェラーゼを溶出させた。得られた活性画分1,800mlを、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)を展開液として、セファデックスG25(担体5,000ml、ファルマシア社製)で脱塩及び緩衝液置換を行った後、0.5MとなるようにNaClを添加した。

40

【0017】これを0.5MNaCl含有の10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)で平衡化した銅キレートセファロースカラム(担体500ml、ファルマシア社製)に吸着させた。次に、0.5MNaCl含有の10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.1)で

5

カラムを洗浄し、0Mから1.0Mへの NH_4Cl の直線濃度勾配でルシフェラーゼを溶出させた。ルシフェラーゼ活性の全工程回収率は約40%であった。還元下SDS電気泳動で単一バンドであり、比活性は $2.4 \times 10^{13} \text{ cps/mg} \cdot \text{protein}$ であった。

【0018】実施例3

実施例2と同様にして得られたプチルトヨパール650Mカラムの溶出液1,800mlを、20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.1)を展開液として、セファデックスG25で脱塩した後、これを20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.1)で平衡化したヘパリンセルロファイン(担体 500ml、生化学工業社製)に吸着させた。

【0019】カラムを20mMトリス塩酸緩衝液(pH7.1)で洗浄後、0Mから1Mへの NaCl (20mMトリス塩酸緩衝液、pH7.1)の直線濃度勾配でルシフェラーゼを溶出したルシフェラーゼの全工程回収率は約42%であった。還元下SDS電気泳動で単一のバ

6

ンドであり、比活性は $2.4 \times 10^{13} \text{ cps/mg} \cdot \text{protein}$ であった。

【0020】実施例4

実施例2で得られた精製ルシフェラーゼを濃縮するために、銅キレートカラムの溶出画分1,050mlをセファデックス・G-25を用いてゲル濾過を行い脱塩した。脱塩した液を20mMトリス塩酸緩衝液で平衡化したDEAEセルロファインA-800(担体 50ml、生化学工業社製)に吸着させ、平衡化と同じ緩衝液で洗浄後、0Mから0.5Mへの NaCl の直線濃度勾配により溶出させた。ルシフェラーゼ活性はほぼ100%の回収率で約10倍に濃縮できた。

【0021】

【発明の効果】本発明によれば、従来工業的製造が困難であったウミホタル・ルシフェラーゼを、簡便な方法で、高純度にかつ高収率で製造することができる。